

落叶果树离体器官再生研究的现状和存在问题

李宝 韩振海

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100094)

摘要 综述了影响落叶果树离体器官再生的因素,主要包括:1) 培养基成分,即培养基中无机营养、有机营养、生长调节物质(BA $4 \sim 7 \text{ mg L}^{-1}$ 或 TDZ $0.02 \sim 3.3 \text{ mg L}^{-1}$ + NAA $0.2 \sim 1.5 \text{ mg L}^{-1}$)、培养基 pH 及凝胶剂;2) 外植体的类型和来源、外植体成熟度或培养时间、外植体处理方法和基因型差异;3) 培养条件,如 $0 \sim 81 \mu\text{mol s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ 的光照培养;4) 其他如添加化学制剂磷酸酶抑制剂(NaF 或 Na_3VO_4 $0.5 \sim 100 \text{ mol L}^{-1}$) 等。今后应重点研究:1) 培养温度变化对离体器官再生的影响;2) 离体器官再生过程中激素作用位点等机理。

关键词 落叶果树;器官再生;培养基;外植体;培养条件

中图分类号 S 660.36

文章编号 1007-4333(2004)01-0031-06

文献标识码 A

Organ regeneration of deciduous fruit trees in vitro : present status and topics to be researched

Li Bao , Han Zhenhai

(College of Agronomy and Biotechnology , China Agricultural University , Beijing 100094 , China)

Abstract The factors influencing organ regeneration of deciduous fruit trees in vitro were reviewed, including 1) the medium composition, such as the inorganic nutrients, organic nutrients, plant growth regulators with BA $4 \sim 7 \text{ mg L}^{-1}$ or TDZ $0.02 \sim 3.3 \text{ mg L}^{-1}$ + NAA $0.2 \sim 1.5 \text{ mg L}^{-1}$, medium pH and gelling agents; 2) types and sources of explants, maturity, treatment methods and genotypic differences; 3) culture conditions, such as incubation under $0 \sim 81 \mu\text{mol s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ light conditions; 4) the addition of chemical additives, such as sodium fluoride or sodium orthovanadate at $0.5 \sim 100 \text{ mol L}^{-1}$. The main aspects for further researches are: 1) effect of different incubation temperature on regeneration; 2) the action sites of plant growth regulators during the incubation of explants.

Key words deciduous fruit trees; organ regeneration; medium; explant; culture condition

果树离体再生研究是体细胞突变和遗传转化研究的基础,为果树品种改良提供了有效的途径,从而得到研究者的重视。影响离体器官再生的因素很多,主要有培养基成分、外植体特性(类型、处理方式)和培养条件,其中任何一个方面的变化都会对再生过程产生重要影响,并最终影响外植体的再生结果。国外自 20 世纪 80 年代中期开始,对果树离体再生进行了广泛的研究,并有多部著作对此进行了论述;国内虽也有一定的研究,但对落叶果树离体再生研究结果的总体论述不多。本文综述了主要落叶果树离体器官再生的研究结果,讨论了应深入研究

的工作,以供进行该方面研究时参考。

1 培养基

1.1 无机营养成分

培养基中矿质营养水平,特别是 NO_3^- , NH_4^+ 和 K^+ 水平对外植体再生有较大影响。一般来说,MS 基本培养基成分对多个树种和品种的离体再生均有较好的效果(表 1)。但 Fasolo 等^[1]认为,低盐培养基比高盐培养基效果更好,尤其是较低质量分数的 N 素对以叶片为主的外植体不定芽再生效果较好。这在苹果^[2]、柿^[3]、李^[4]、葡萄^[5]等树种上得到证实。

收稿日期:2003-07-18

基金项目:北京市重点实验室“果树逆境生理研究与分子生物学实验室”基金及“教育部高校青年教师教科奖励基金”资助项目

作者简介:李宝,博士;韩振海,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事果树生理及分子生物学研究。

表1 主要落叶果树离体器官再生研究结果

Table 1 Results of organogenesis *in vitro* for major deciduous fruit trees

树种	品种及外植体类型	培养基及激素水平/(mg L ⁻¹)	再生率及再生芽数	参考文献
苹果	<i>Malus domestica</i>			
	金冠 叶片/子叶/上胚轴	MS, BA 1.0 + NAA 0.3 ~ 1.0	65 %/ 3.5	[35]
	嘎拉 等 叶片	N6/LS, BA 5.0/ TDZ 1.0 + NAA 0.3 ~ 1.0	92 %/ 7.1	[1]
	嘎拉 等 叶片	MS, BA 1.0 + NAA 0.3 ~ 1.0	100 %/ -	[2]
	Empire 等 叶片	MS/ N6, BA 5.0 ~ 7.5 + NAA 0.2	70 % ~ 100 %/ 5 ~ 16	[6]
	Macspur 等 叶片	MS, BA 2.7 ~ 5.4/ TDZ 0.44 ~ 0.66	- / 6 ~ 10	[29]
	嘎拉 等 叶片	MS, BA 5.0/ TDZ 0.22 + BOA 21.5 μmol L ⁻¹	54 %/ -	[17]
	世界第一 等 叶片	MS, BA 5.0 + NAA 0.3	5 % ~ 100 %/ -	[41]
	皇家嘎拉 茎段	N6, TDZ 0.05	100 %/ 68.8	[33]
	富士 茎段	MS, TDZ 2 ~ 5 + NAA 0.1	90 %/ -	[22]
	金冠 幼胚	NN, BA 4.0	- / 30	[32]
	<i>Malus pumila</i>			
	M9, Ottawa 叶片	MS, BA 2.3 + NAA 0.2	79 %/ 1.8	[9]
	M7, M26 叶片	MS, TDZ 0.88 + NAA 0.5	11 %/ -	[2]
M26 叶片	MS, BA 5.0 + IBA 0.1	90 %/ 8	[13]	
M26 叶片	MS, BA 5.0 + NAA 0.24	76 %/ 4.5	[17]	
M26 等 叶片	MS, BA 0.45 + NAA 0.1	95 %/ -	[30]	
<i>Malus prunifolia</i>				
AM84-A 茎段	MS, TDZ 2 ~ 5 + NAA 0.1 + ABA 3.0	94 %/ -	[22]	
梨	<i>Pyrus pyrifolia</i>			
	Hosui 等 叶片	B5, TDZ 1.1 + GA 0.1	94 %/ -	[22]
桃	<i>Prunus persica</i>			
	Flordaguard 等 子叶	MS, TDZ 1.38/ 2.75 + IBA 0.25/ 0.5	6 % ~ 60 %/ -	[43]
李	<i>Prunus domestica</i>			
	Stanley 等 下胚轴	MS, TDZ 1.65 + IBA 0.5	45 %/ 8	[44]
杏	<i>Prunus armeniaca</i>			
	Zard, NJA82 叶片/子叶	MS, TDZ 1.1 ~ 2.2 + IBA 0.2/ 1.0	80 %/ -	[19]
樱桃	<i>Prunus cerasus</i>			
	Bailey 子叶	MS, TDZ 1.1 ~ 2.75 + IBA 0.5	67 %/ 15.5	[45]
	<i>Prunus avium</i>			
Charger 等 叶片	WPM, TDZ 0.97 + NAA 0.1	50 %/ -	[46]	
扁桃	<i>Prunus dulcis</i>			
	Boa Casta 叶片	MS, TDZ 1.5 + IAA 0.5/ 2, 4 - D 0.01	40 %/ 2.2	[18]
葡萄	<i>Vitis vinifera</i>			
	汤姆森无核 等 叶片	NN, BA 2.0	90 %/ -	[5]
	Sonaka 卷须	E & R, BA 0.23	成苗	[47]
猕猴桃	<i>Actinidia deliciosa</i>			
Hayward 等 叶片	Cheng 's K, ZT 1.0	100 %/ 9.2	[48]	
草莓	<i>Fragaria sp.</i>			
	Redcoat 等 叶片	MS, BA 2.3 + IAA 1.8	94 %/ 13	[36]
越橘	<i>Vaccinium sp.</i>			
	Duke 等 叶片	MS, ZR 4.4	- / 20.8	[23]
	Bilberry 等 叶片/下胚轴	MS, TDZ 0.2 ~ 0.6	75 %/ -	[20]
树莓	<i>Rubus idaeus</i>			
	Summit 等 叶片	MS/ N6, TDZ 0.22 ~ 2.2 + IBA 0.1	86 %/ 7.9	[49]
	N71-B3 叶片	MS, BA 2.2 ~ 0.6 + IBA 1.0	73 %/ -	[14]
柿	<i>Diospyros kaki</i>			
	富有 等 叶片/茎段	1/2 MS, ZT 2.2 + NAA 0.02	2 % ~ 72 %/ -	[31]
Jiro 根段	MS, ZT 1.1 ~ 2.2 + IAA 1.4 ~ 1.8	85 %/ -	[3]	

Yepes 和 Aldwinckle 推测, 1/2 或 1/4 MS、N6、NN、WPM 等培养基的 N 素水平较低, 可刺激外植体形态发生^[6]。

不仅 N 素的总量对再生有影响, N 素的形态和比例也同样重要。对‘元帅’等叶片进行离体培养时, 当 NO₃⁻ 的质量分数为总 N 的 80%~90% 时, 不定芽仍能形成, 但 NO₃⁻ 为惟一 N 源时, 再生则受到抑制^[3]。而采用 NN 培养基时, 无论总 N 含量高低, NO₃⁻ 与 NH₄⁺ 的比例为 2:1 或 3:1 时, 梨叶片不定芽再生最好^[7]。由于试材基因型不同, 结果会有所差异。Fasolo 等^[1]和 Sriskandarajah 等^[8]发现降低总 N 水平及改变 NO₃⁻ / NH₄⁺ 的比例并没有明显影响某些基因型(如‘旭’)不定芽的再生。

K 为植物体所必需的惟一的一价阳离子, 对其在不定芽再生中的作用研究较少, 值得进一步深入研究。由于培养基是依据植物必需营养元素研制而来的, 其成分包含了植物生长发育所必需的多种无机营养, 成分复杂, 所以其影响不是单一的, 而是多方面的。MS 培养基是用于烟草愈伤组织培养的最佳培养基, 虽然具有通用性, 但在实际应用时, 以对特定试材进行比较研究、确定为宜。

1.2 有机碳源

碳源可以影响植物的发育过程, 不同树种、品种对碳源要求存在差异。苹果、梨叶片对蔗糖含量变化反应不敏感^[9], 而 Druart 在樱桃上对 6 种糖源(蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖、山梨醇和甘露醇)的研究发现, 相同含量时麦芽糖表现最好^[10]。在草莓^[11]和苹果^[12]上分别以高含量蔗糖(5%)和通常含量果糖(3%)为碳源时, 不定芽再生数量最多。

1.3 生长调节物质

激素在植物发育过程中具有的重要作用, 是植物发育和离体再生研究的重点。激素组合可以调节细胞分裂、芽增殖、愈伤组织形成等。

1.3.1 BA + NAA 生长调节剂的组合和用量是不定芽再生研究中最重要因素。

对叶片再生来说, BA + NAA 是一个较好的组合, 而且需要较高的分裂素/生长素的比值^[13]。其中, 苹果上 BA 一般为 4~7 mg L⁻¹, > 10 mg L⁻¹ 时, 再生效果显著下降; NAA 一般介于 0.2~1.5 mg L⁻¹ (表 1)。Welander 等^[9]还发现, 苹果外植体对 NAA 的反应比对 BA 的反应强烈。但在草莓和樱桃上生长素类物质抑制再生, 一般只采用 BA^[14,15]。

1.3.2 TDZ + NAA

TDZ 是与 BA 作用类似的生

长调节物质, 在较低含量下即可刺激不定芽的形成和发育, 其活性强于 BA^[16], 从而, TDZ + NAA 成为另一个较好的激素组合, 在多种果树上有较好的效果。苹果上 TDZ 含量介于 0.02~3.3 mg L⁻¹ 较为适宜(表 1), 含量过高抑制再生且效果不稳定^[2], 到 11 mg L⁻¹ 时会完全抑制外植体不定芽的形成^[1]。梨离体叶片再生中, TDZ 在 0.2 mg L⁻¹ 时效果差, 0.6~1.3 mg L⁻¹ 较适宜, 超过 2.6 mg L⁻¹ 则有害^[7], 且在某些基因型上, TDZ 效果不如 BA, 易引起‘玻璃化’现象^[17]。TDZ + 生长素可促进扁桃叶片离体再生, 而用 BA + 生长素却没有成功^[18]。TDZ(1.1~2.2 mg L⁻¹) + IBA(0.2~1.0 mg L⁻¹) 可用于杏的离体再生, 高含量 TDZ 时再生芽呈畸形^[19]。此外, TDZ(0.2~0.6 mg L⁻¹) 可以消除越橘离体再生时的基因型差异^[20]。猕猴桃上, 低含量的 TDZ 可形成高质量的再生苗, 而在含 BA 的培养基上未产生不定芽^[21]。由此可见, TDZ 在不同树种上、甚至在同一树种的不同基因型间都有明显的不同, 应予以关注。

1.3.3 其他生长调节物质

Saito 和 Suzuki^[22]在对 BA, 2iP, CPPU, TDZ 的研究中发现, TDZ(2~5 mg L⁻¹) 时外植体再生效果最好, 其次是 CPPU(3~5 mg L⁻¹), BA 和 2iP 几乎无效。在含 KT 或 2iP 的培养基上, 苹果的再生芽生长比在含 BA 的培养基上好^[8]。另外, Caboni 等^[17]在苹果上对 BOA(2-benzisoxazole-3-acetic acid) 进行的研究发现, 在某些基因型上 BOA 优于 NAA, 但却完全抑制了‘旭’叶片的再生。柿上, 多采用 ZT(0.22 mg L⁻¹) + IAA(0.18~1.8 mg L⁻¹), 高含量的生长素特别是 2,4-D 抑制再生^[3], 在越橘上 ZR 明显优于 2iP 或 ZT, 不含 NAA 时再生最好^[23], 可能是玉米素类似物比纯玉米素等诱发不定芽的能力强。

总之, 由于植物离体再生是一个复杂的过程, 再生过程中的各个环节均会对最终的再生结果产生影响, 最优的生长调节剂种类及用量可被品种、暗处理时间、生长素的有无等多种因素影响。

1.4 培养基 pH 值

培养基无机盐、碳源、凝胶剂、活性炭、培养基储藏方法等对培养基的 pH 有影响^[24], 而培养基 pH 可以通过影响营养和激素的有效性及其吸收, 影响多种离体培养植株的发育过程, 且反应不一致。Marino 等^[25]在对猕猴桃的研究中发现, pH 7.0~7.5 时愈伤组织生长最好, 而 pH < 5.7 时不定芽生

长最好, pH 较高时再生效果明显降低, 可能是 pH 影响植物生长调节剂的吸收。

1.5 凝胶剂

凝胶剂可以影响植物的发育过程^[26]。通常培养基的凝胶剂采用 6~8 g·L⁻¹ 的琼脂。但 Debergh^[27] 的研究表明, 琼脂的品牌、用量均会影响培养基的化学和生理特性, 并影响外植体对矿质元素 (Ca²⁺, K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺) 的吸收。Welanders 等在苹果上^[9]、Chevreau 等在梨上^[28], 以 Gelrite 或 Phytigel 替代琼脂, 发现二者对再生有极好的正效应, 细胞分裂迅速, 可形成更多不定芽, 并减少‘玻璃化’苗的产生。Saito 等^[22] 认为 Gelrite 可能含有类似细胞分裂素的作用因子。

1.6 其他化学添加剂

一些化学药剂可以降低胁迫反应, 抑制乙烯合成或减少膜伤害, 从而促进外植体的再生^[38]。例如, 秋水仙素^[39]、磷酸酶抑制剂 NaF 或 Na₃VO₄ (0.5~100 μmol·L⁻¹)^[40] 等影响外植体代谢过程从而影响再生结果。

2 外植体及处理方式

2.1 外植体的类型和来源

由于植物细胞具有全能性, 所以外植体可采用多种类型的器官, 主要有叶片、花器官、根、胚及其组织、茎等 5 种 (表 1)。叶片为外植体时, 组培苗的叶片优于田间或温室栽培树上的叶片。另外, 外植体再生不定芽存在明显的基因型差异 (表 1)。Sarwar 等^[29]、何道一等^[30] 认为, BA 使用量与生长特性有关, 而遗传背景相同的材料对激素的反应相近。因此, 为特定的基因型建立适合的再生体系应成为研究中的重点^[31]。

2.2 外植体成熟度或培养时间及处理方法

外植体器官发生能力与其母体的发育阶段或时期密切相关。Kouider 等^[32] 对苹果的研究表明, 花后 4 周不带种皮和胚乳的胚, 只产生愈伤组织, 6.5 周的胚可以产生多个不定芽, 且生芽数随着时间延长而增多, 到 10.5 周每胚生芽数最高。而且, 近成熟的新鲜胚再生不定芽较快。组培苗幼嫩的叶片再生效果较老叶好, 其中以最上部 3~4 片展开的叶片效果最好^[1,9], 但不同基因型的叶片大小之间存在差异, 具有基因型依赖性^[6,8,9]。以茎段为外植体时, 组培苗最上部的 2 个节间最好^[33]。此外, 外植体处理和放置方式也会对再生结果产生影

响^[6,9,34]。因此, 应该注意根据外植体的特性研究最适宜的激素配比等条件, 才能获得特定基因型的最佳再生结果。

3 培养条件

培养条件主要包括光照、温度、湿度, 对光照的影响研究的较多, 而对后两者的研究较少。Liu 等^[35] 认为接种后最初的暗培养是再生过程所必需的, 而且光照的抑制作用不可逆转。“金冠”叶片和子叶先暗培养 3 周, 然后光照条件下培养 4 周与直接光照下培养 7 周相比较, 前者的再生效率是后者的 5~10 倍; 光照对上胚轴的不定芽再生没有影响。Kouider 等^[32] 对苹果子叶再生的研究中发现, 先暗培养然后移至光下, 3 周内可以再生不定芽, 而直接置于光下培养, 此进程滞后。随后的研究多采用 2~3 周的暗培养。接种后最初的暗培养 (0~81 mol·s⁻¹·m⁻²) 成为广泛应用的措施。

试材及处理方法不同, 其要求的暗培养时间有所不同^[2,36,37]。苹果上的研究表明, 诱导不定芽发生时, 以红光或暗处理最为有效, 而在不定芽生长期则是白光稍强较为有利^[35]。

4 应加强研究的问题

虽然国内外对植物的离体再生研究已有多年且对离体再生影响因素进行了较为深入的研究, 但因再生过程涉及因素较多, 因而, 对其机理仍未确切认识, 尤其在多年生木本果树上更为如此。为进一步认识离体器官再生的机制, 加强离体培养的应用, 今后研究应注意以下几个方面: 1) 离体再生具有较强的基因型特异性, 为特定的基因型建立适合的高效再生体系, 诸如激素配比的最终结果等培养基的确立, 以为进一步应用奠定基础; 2) 培养基成分中, P 和 K 素的作用研究较少, 矿质元素的确切机理仍未明确认识, 尤其是其对外植体的细胞生物学方面的影响; 3) 光质和温度等条件对再生的进程及结果作用尚不深入; 4) 深入研究离体再生机理, 研究非基因型依赖性的离体再生操作方式, 以消除基因型依赖性, 增大遗传改良的普遍性及应用范围。

参 考 文 献

- [1] Fasolo F, Zimmerman R H, Fordham I. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars[J]. Plant Cell Tiss Org Cult,

- 1989, 16(2): 75 ~ 87
- [2] Korban S S, O'Connor P A, Elobeidy A. Effects of thidiazuron, naphthaleneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves[J]. J Hort Sci, 1992, 67(3): 341 ~ 349
- [3] Tetsumura T, Yukinaga H. High-frequency shoot regeneration from roots of Japanese persimmon [J]. HortScience, 1996, 31(3): 463 ~ 464
- [4] Escalettes V, Dosba F. *In vitro* adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp[J]. Plant Science, 1993, 90(2): 201 ~ 209
- [5] Stamp J A, Colby S M, Meredith C P. Improved shoot organogenesis from leaves of grape[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1990, 115(6): 1038 ~ 1042
- [6] Yepes L M, Aldwinckle H S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1994, 37(3): 257 ~ 269
- [7] Abu-Qaoud H, Skirvin R M, Below F E. Influence of nitrogen form and NH_4^+ -N NO_3^- -N ratios on adventitious shoot formation from pear (*Pyrus communis*) leaf explants in vitro[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1991, 27(3): 315 ~ 319
- [8] Srisankarajah S, Skirvin R M, Abu-Qaoud H, et al. Factors involved in shoot elongation and growth of adventitious and axillary shoots of three apple scion cultivars *in vitro*[J]. J Hort Sci, 1990, 65(2): 113 ~ 121
- [9] Welander M, Maheswaran G. Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks[J]. J Plant Physiol, 1992, 140(2): 223 ~ 228
- [10] Druart P. Effect of culture condition and leaf selection on organogenesis of *Malus domestica* cv. 'McIntosh', 'Wijcik', and *Prunus canescens* Bios 'GM79'[J]. Acta Hort, 1990, 280: 117 ~ 119
- [11] Lis E K. Strawberry plant regeneration by organogenesis from peduncle and stolon segments [J]. Acta Hort, 1993, 348: 435 ~ 438
- [12] 李宝, 韩振海. 氮源比例和不同碳源对珠美海棠离体叶片再生不定芽的影响[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(3): 253 ~ 258
- [13] Ferradini N, Famiani F, Proietti P, et al. Influence of growth regulators and light on *in vitro* shoot regeneration in M. 26 apple rootstock[J]. J Hort Sci, 1996, 71(6): 859 ~ 865
- [14] Hoepfner A S, Nestby R, Nybom H. Genetic deviation initiated by adventitious shoot regeneration from tissue cultured red raspberry[J]. J Hort Sci, 1996, 71(1): 71 ~ 79
- [15] Tang H, Ren Z, Krczal G. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants[J]. Plant Cell Rpt, 2000, 19(9): 881 ~ 887
- [16] Murthy B N S, Murch S J, Saxena P. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis[J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 1998, 34(4): 267 ~ 275
- [17] Caboni E, Tonelli M G. Effect of 1,2-benzisoxazole-3-acetic acid on adventitious shoot regeneration and *in vitro* rooting in apple[J]. Plant Cell Rpt, 1999, 18(12): 985 ~ 988
- [18] Miguel C M, Druart P, Oliveira M. Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explant [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 1996, 32(3): 148 ~ 153
- [19] Goffreda J C, Scopel A L, Fiola J A. Indole butyric acid induces regeneration of phenotypically normal apricot (*Prunus armeniaca* L.) plants from immature embryos [J]. Plant Growth Reg, 1995, 17(1): 41 ~ 46
- [20] Shibli R A, Smith M A L. Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahalae* (ohelo) and *V. myrtillus* (bilberry) leaf explants[J]. HortScience, 1996, 31(7): 1225 ~ 1228
- [21] Seelye J F, Butcher S M. *In vitro* response of Actinidia leaf and callus tissue to thidiazuron[J]. New Zealand J Crop Hort Sci, 1991, 19(4): 447 ~ 450
- [22] Saito A, Suzuki M. Efficient shoot-regeneration from calli of apple rootstock (*Malus prunifolia* var. ringo Asami Mo84-A) and cultivar (*Malus domestica* cv. Fuji) [J]. J Plant Physiol, 1999, 155(4-5): 620 ~ 624
- [23] Rowland L J, Ogden E L. Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of high-bush blueberry[J]. HortScience, 1992, 27(10): 1127 ~ 1129
- [24] Owen H R, Wengerd D, Miller A R. Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method[J]. Plant Cell Rpt, 1991, 10(11): 583 ~ 586
- [25] Marino G, Battistini S. Leaf-callus growth, shoot regeneration and somaclonal variation in *Actinidia deliciosa*: effect of media pH [J]. Acta Hort, 1990, 280: 37 ~ 44
- [26] Pasqualetto P L, Zimmerman R H, Fordham I. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala' apple *in vitro*[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1986, 111(6): 976 ~ 980

- [27] Debergh P C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium (*Cynara scolymus*, globe artichoke) [J]. *Physiol Plant*, 1983, 59(2): 270 ~ 276
- [28] Chevreau E, Mourgues F, Neveu M, et al. Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaves of pear [J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 1997, 33(3): 173 ~ 179
- [29] Sarwar M, Skirvin R M. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus domestica* Borkh.) *in vitro* [J]. *Sci Hort*, 1997, 68(1-4): 95 ~ 100
- [30] 何道一, 李雅志, 王其会. 不同基因型苹果的离体再生特性及其对 NaN_3 的反应 [J]. *核农学报*, 1997, 11(2): 84 ~ 88
- [31] Tao R, Sugiura A. Adventitious bud formation from callus cultures of Japanese persimmon [J]. *HortScience*, 1992, 27(3): 259 ~ 261
- [32] Kouider M, Korban S S, Skirvin R M, et al. The relationship of apple embryos and their cotyledons to maturity, dormancy, and the potential to form shoots *in vitro* [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1985, 110(1): 93 ~ 96
- [33] Liu Q, Salih S, Hammerschlag F. Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus domestica* Borkh.) shoots promotes high frequency shoot organogenesis and enhanced -glucuronidase expression from stem internodes [J]. *Plant Cell Rpt*, 1998, 18(1-2): 32 ~ 36
- [34] 时保华, 付润民, 赵政阳, 等. 苹果叶片离体培养研究 [J]. *西北植物学报*, 1995, 15(1): 67 ~ 72
- [35] Liu J R, Sink K C, Dennis F G. Plant regeneration from apple seedling explants and callus cultures [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1983, 2(4): 293 ~ 304
- [36] Nehra N S, Stushnoff C, Kartha K K. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1989, 114(6): 1014 ~ 1018
- [37] 徐凌飞, 马锋旺, 王之, 等. 梨叶片离体培养和植株再生 [J]. *园艺学报*, 2002, 29(4): 367 ~ 368
- [38] Perl A, Lotan O, Abu-Abied M, et al. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): The role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions [J]. *Nature Biotech*, 1996, 14(5): 624 ~ 628
- [39] Swartz H J, Bors R, Mohamed F, et al. The effect of *in vitro* pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1990, 21(2): 179 ~ 184
- [40] Grafe C, Wricke G. Increase of *in vitro* regeneration in *Malus domestica* by the application of phosphatase inhibitors [J]. *Plant Breeding*, 1998, 117(6): 563 ~ 566
- [41] 孙清荣, 孙洪雁, 石荫坪, 等. 苹果叶片不定梢诱导及起源的细胞组织学观察 [J]. *农业生物技术学报*, 2002, 10(1): 86 ~ 89
- [42] Lane W D, Iketani H, Hayashi T. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1998, 54(1): 9 ~ 14
- [43] Pooler M R, Scorza R. Regeneration of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) rootstock cultivars from cotyledons of mature stored seed [J]. *HortScience*, 1995, 30(2): 355 ~ 356
- [44] Mante S, Morgens P H, Scorza R, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.) hypocotyl slices and regeneration of transgenic plants [J]. *Bio/ Tech*, 1991, 9(9): 853 ~ 857
- [45] Mante S, Scorza R, Cordts J M. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica* and *Prunus cerasus* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1989, 19(1): 1 ~ 11
- [46] Hammatt N, Grant N J. Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry) [J]. *Plant Cell Rpt*, 1998, 17(6-7): 526 ~ 530
- [47] Salunkhe C K, Rao P S, Mhatre M. Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera* L. [J]. *Plant Cell Rpt*, 1997, 17(1): 65 ~ 67
- [48] González M V, Rey M, Rodríguez R. Plant regeneration from petioles of kiwifruit microshoots [J]. *HortScience*, 1995, 30(6): 1302 ~ 1303
- [49] Turk B A, Swartz H J, Zimmerman R H. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of *Rubus* genotypes [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1994, 38(1): 11 ~ 17